

27. 9. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 18 NOV 2004	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 9月12日

出 願 番 号
Application Number: 特願 2003-321564
[ST. 10/C]: [JP 2003-321564]

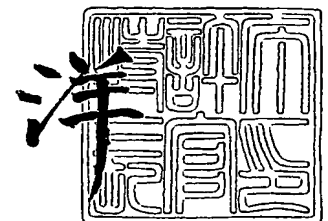
出 願 人
Applicant(s): 株式会社カネカ
独立行政法人産業技術総合研究所
財団法人先端医療振興財団

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2004-3099163

【書類名】 特許願
【整理番号】 TKS-5118
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
C12N 15/11
C12P 21/08

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区港島南町二丁目 2 番先端医療センター内 財
団法人 先端医療振興財団
【氏名】 正札 智子

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺 3 丁目 1 1 番 4 6 号 独立行政法人産業技術
総合研究所関西センター 尼崎事業所内
【氏名】 金村 米博

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺 3 丁目 1 1 番 4 6 号 独立行政法人産業技術
総合研究所関西センター 尼崎事業所内
【氏名】 三宅 淳

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県明石市魚住町西岡 2 5 6 8 - 3
【氏名】 丹羽 英夫

【発明者】
【住所又は居所】 香川県高松市神在川窪町 3 3 2 - 3
【氏名】 山下 憲司

【特許出願人】
【識別番号】 000000941
【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社
【代表者】 代表取締役社長 武田 正利

【特許出願人】
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人 産業技術総合研究所
【代表者】 理事長 吉川 弘之

【特許出願人】
【識別番号】 300061835
【氏名又は名称】 財団法人 先端医療振興財団
【代表者】 理事長 矢田 立郎

【代理人】
【識別番号】 100086586
【弁理士】
【氏名又は名称】 安富 康男

【選任した代理人】
【識別番号】 100113468
【弁理士】
【氏名又は名称】 佐藤 明子

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 033891
【納付金額】 10,500円

【その他】 国以外のすべての者の持ち分の割合 5 0 / 1 0 0

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0003934

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列番号 1 に記載の塩基配列全部または一部を有する DNA。

【請求項 2】

配列番号 2 または配列番号 3 に記載の塩基配列を有する DNA。

【請求項 3】

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項 4】

配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項 5】

配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するペプチド。

【請求項 6】

請求項 3～5 のいずれかに記載のペプチドを抗原として得られた抗体。

【請求項 7】

抗体の種類がポリクローナル抗体である請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

抗体の種類がモノクローナル抗体である請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 9】

請求項 1 もしくは 2 に記載の DNA、または、請求項 3～5 のいずれかに記載のペプチド、または全てを用いた神経幹細胞／前駆細胞の検出方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法のいずれか、または全てを用いた神経分化因子あるいは神経分化抑制因子として機能する薬剤をスクリーニングする方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規な神経幹細胞マーカー

【技術分野】

【0001】

本発明は、複数の細胞種から構成される組織或いは細胞集団から神経幹細胞／前駆細胞を検出する方法に関する。また本発明は、複数の細胞種から構成される組織或いは細胞集団に対して分化を誘導する過程または操作を施した時に神経幹細胞／前駆細胞の形質を維持させる、あるいは分化した神経細胞の集団に対して神経幹細胞／前駆細胞を誘導することが可能な薬剤、操作等のスクリーニング法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、損傷を受けた中枢神経系は、神経機能を司るニューロン自身に分裂能がないために機能修復が不可能であると考えられていた。しかし、近年、成体・成人の中枢神経系においても自己複製能、多分化能ともに有する神経幹細胞が存在することが明らかになり、中枢神経系においても幹細胞から機能する細胞、組織を分化させることにより損傷された組織、臓器を補完する、いわゆる再生医療の可能性が現実的なものとなってきた（非特許文献1）。また、神経幹細胞が見出されたことにより、神経幹細胞に作用して、ニューロンやグリアなどの機能する神経細胞に分化させる薬剤をスクリーニングすることも可能となった（非特許文献2）。

【0003】

脊髄損傷をはじめパーキンソン病やアルツハイマー病等の中枢神経系の疾患に対する治療法は様々なものが試みられているが、これらの疾患を完治できる治療法は、現在のところ見出されていない。しかし、中枢神経系に対する再生医療や神経幹細胞から機能する神経細胞への分化を誘導する薬剤は中枢神経系の疾患の根本的な治療法をもたらすことになるが、これらのことを可能にするためには、何らかのマーカーを用いて神経幹細胞を分離することが必須である。中枢神経系においてはNestinやMusashil、 α -チューブリン等の神経幹細胞マーカー遺伝子が既に同定されている（非特許文献3及び4）。これらの遺伝子を用いることにより神経幹細胞／前駆細胞を同定することは基本的には可能であるが、各遺伝子ともマーカーとしての機能に一長一短がある。

【0004】

【非特許文献1】 Reynolds, B. A. et al. (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. J. Neurosci. 12:4565-74

【非特許文献2】 Roy, N. et al. (2000) In vitro neurogenesis by neural progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. Nat. Med. 6:271-77

【非特許文献3】 Keyoung H. M. et al. (2001) High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal brain. Nat. Biotech. 19:843-50

【非特許文献4】 Miller F. et al. (1987) Isoforms of α -tubulin are differentially regulated during neural maturation. J. Cell. Biol. 105:3065-73

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、新たな神経幹細胞マーカーを見い出して、複数の細胞種から構成される組織或いは細胞集団から神経幹細胞／前駆細胞を検出する方法、さらにはそれを選別する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題を解決するために、本発明者らはNC1遺伝子に注目した。NC1は、家族性持続性過インスリン性低血糖症 (persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy; PHHI) 患者の膵臓に特異的に発現している遺伝子として見出されたものであるが、正常組織においては、脳で特異的に発現している遺伝子であることが示されている。本発明者らはさらに詳細にNC1遺伝子の機能を検討し、以下に述べる方法によりこの遺伝子が神経幹細胞／前駆細胞の検出手段として機能することを明らかにした。

【0007】

神経幹細胞は、増殖し継代を繰り返すことができる (自己複製能) と同時に、ニューロンやグリア細胞等の中枢神経系を構成する細胞を作り出すことのできる (多分化能) 未分化な神経系の細胞として定義される。神経幹細胞／前駆細胞の選択的培養法 (neurosphere法) はWeissらによって確立されている (Science, 255, 1707 (1992))。Weissらの方法は、マウス胎生期脊髄や線条体より得た神経幹細胞／前駆細胞を含む中枢神経系の細胞群をEGF (epidermal growth factor) またはFGF2 (fibroblast growth factor 2) を加えた無血清培地で培養すると多くの細胞は無血清の環境下で障害されるが、神経幹細胞／前駆細胞はこの培養条件で増殖し細胞塊 (neurosphere) を形成して浮遊するというものである。

【0008】

本発明者らはヒト胎児の脊髄及び前脳から調製した細胞からneurosphereを形成させ、それを血清存在下で培養することによりニューロンやグリア細胞に分化させる系を確立している。この系を用いてNC1遺伝子の発現を検討したところ、neurosphereの状態、即ち神経幹細胞／前駆細胞ではその発現は高く、ニューロンやグリア細胞への分化にともなって発現が低減することを見出した。このことから、NC1遺伝子の発現を指標に神経幹細胞／前駆細胞を検出し、それを選別することが可能であると考えられる。したがって、新たな神経幹細胞マーカーとしてNC1遺伝子を利用する妥当性が示されたことになり、本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明は、NC1遺伝子の発現を検出するために用いることのできる配列番号1～3の配列を有するDNAに関する。

また、本発明は、NC1遺伝子産物と特異的に反応し、NC1遺伝子の発現を検出するために用いることのできる抗体のエピトープとなる配列番号4～6のペプチドに関する。

さらに本発明は、上記のDNA、またはペプチド、またはその両方を用いてNC1遺伝子の発現を検出する方法及びNC1遺伝子の発現を指標に神経分化因子等として機能する薬剤をスクリーニングする方法に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明のNC1遺伝子及びNC1タンパク質は神経系の細胞の分化過程に関与していると考えられ、神経幹細胞／前駆細胞を検出、選別できる神経幹細胞マーカーとして応用することが期待される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明において対象とする神経幹細胞／前駆細胞は、試験管内または生体内でニューロンやグリア細胞等の機能を有する神経細胞に分化するものであれば動物種、形態、発生段階

等特に限定されるものではないが、望ましくは哺乳動物、さらに臨床応用上の観点からヒト由来であることが望ましい。

【0012】

ある組織や細胞等に目的の遺伝子が発現していることを検出する方法として例えばノーザン法がある。NC1 遺伝子が神経幹細胞／前駆細胞で高い発現を示すことから、ノーザン法を用いて例えば配列番号1に記載されている塩基配列をプローブとして生体組織あるいは複数の細胞種から成る細胞集団において神経幹細胞／前駆細胞を検出することが可能である。プローブとして用いるDNAはこの塩基配列のものに限定されるものではなく、NC1 遺伝子由来のmRNAを特異的に認識するものであれば全てプローブとして利用することができる。

【0013】

プローブの標識物質としては ^{32}P 、 ^{35}S 等の放射性物質やアルカリ性ホスファターゼ、ホースラディッシュ・パーオキシダーゼ等の酵素、あるいはフルオロセイン・イソチオシアネート等の蛍光物質があるが、特に限定されるものではない。プローブの標識方法も酵素的に結合させる方法、化学的に結合させる方法、さらに（実施例1）で用いたような試験管内転写系による方法等があるが、特にこれらの方法に限定されるものではない。

【0014】

また、目的の遺伝子が発現していることを検出する方法もノーザン法に限定されるものではなく、例えばRT-PCRやプライマー・イクステンション法等によっても同様のことを行うことができる。この場合、配列番号2及び3に記載されている塩基配列をプライマーとして用いることができるが、これらに限定されるものではなく、NC1 遺伝子由来の塩基配列と見なされる塩基配列を有するDNA断片を増幅する、あるいはNC1 遺伝子の転写産物を特異的に認識するものであれば全てプライマーとして利用することができる。

【0015】

また、ある細胞に目的のタンパク質が存在することを検出する方法として例えばウェスタン法があるが、NC1 遺伝子の遺伝子産物と特異的に反応する抗体を用いて生体組織あるいは複数の細胞種から成る細胞集団において神経幹細胞／前駆細胞を検出することが可能である。このような抗体を作製するためには抗原となる蛋白質またはペプチドを作製する必要がある。NC1 遺伝子産物は247アミノ酸から成る蛋白質であるが、抗原となる蛋白質を作製することは遺伝子工学的手法を用いるとしても作製工程が若干複雑になる。そこで本発明者らは、作製の容易なペプチドを抗原として用いることとし、アミノ酸の疎水性度や塩基性度等からエピトープとなりうる可能性のある配列として配列番号4～6に記載されているアミノ酸配列を選択した。ただし、NC1 遺伝子産物と反応する抗体を作製するための抗原としては、ここで記載したペプチドに限定されるものではなく、247アミノ酸から成るNC1 遺伝子産物の全部または一部を用いてもよい。さらに抗原の作製や精製を容易にするために、タグ配列として機能するFLAGやMycペプチドのようなNC1 遺伝子産物以外のアミノ酸配列を含む蛋白質またはペプチドを抗原とすることも可能である。また、本発明で抗原として用いたペプチドはペプチド合成装置を用いて固相法により合成したが、合成の方法や形態、装置等は特に限定されない。

【0016】

上記NC1 遺伝子産物と反応する抗体としては特に限定されず、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の作製方法としては、従来公知の方法を使用することができる。

【0017】

目的のタンパク質が存在することを検出する方法としてウェスタン法の他にも組織免疫染色や免疫沈降法等があるが、このような方法によってもNC1 遺伝子産物を認識する抗体を用いて生体組織あるいは複数の細胞種から成る細胞集団において神経幹細胞／前駆細胞を検出することが可能である。

【0018】

本発明による神経幹細胞／前駆細胞の検出方法を利用することにより、例えば次のような

方法で神経分化因子あるいは神経分化抑制因子等として機能する薬剤をスクリーニングする方法が提供される。

【0019】

神経幹細胞／前駆細胞を含む *neurosphere* は血清等の刺激によりニューロンやグリア細胞等の神経細胞に分化する。このような神経細胞を分化させる培養系に神経分化因子あるいは神経分化抑制因子等として機能する薬剤の候補となる物質、あるいはそれらが含まれる可能性のある抽出物等を添加し、本発明による検出法を用いて培養系に含まれる神経幹細胞の数、あるいは神経幹細胞マーカーである NC1 遺伝子の発現の強弱等を指標に目的の活性を有する薬剤をスクリーニングすることができる。神経細胞を分化させる培養系としては *neurosphere* の系が最も適当であるが、分化に伴って NC1 遺伝子の発現が変化するような培養系であれば特に限定されるものではない。また、神経分化因子あるいは神経分化抑制因子等として機能する薬剤の候補となる物質、あるいはそれらが含まれる可能性のある抽出物等としては、化学的に合成された化合物、微生物や培養細胞の培養液、生物の個体あるいは組織の抽出物等が考えられるが特に限定されるものではない。

【実施例】

【0020】

以下に実施例をあげて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない

【0021】

(実施例 1) ノーザン法による NC1 遺伝子発現の検出

ノーザン法により NC1 遺伝子の発現を検出するために以下に述べる実験を行った。

【0022】

(1) 検出用プローブの調製

遺伝子発現の検出に用いるプローブは、NC1 遺伝子に相当する DNA 断片を組み込んだベクターを用いた試験管転写系により作製した。具体的には、以下に示す方法によった。プライマーとして配列番号 2 に記載されている塩基配列及び配列番号 3 に記載されている塩基配列に XhoI 部位を付加したオリゴヌクレオチドを用いた。鋳型は CLONTECH 社製のヒト胎児 cDNA ライブラリーの一部を熱処理し、遠心により残渣を沈殿させた上清を用いた。上記プライマーと鋳型を用い、PCR により NC1 遺伝子特異的配列を有する DNA 断片を増幅した。これを XhoI で切断した後、ベクター (Promega 社製 pGEM-T Easy) にサブクローニングした。このベクターにはプローブ断片として配列番号 1 に記載されている塩基配列が含まれることになる。このベクターを用いて試験管内転写系により DIG-11-UTP (Roche Molecular Biochemicals 社製) 標識 RNA プローブを作製した。

【0023】

(2) 神経幹細胞／前駆細胞の培養と分化誘導

ヒト胎児前脳及び脊髄から組織片を採取し、*neurosphere* 培養法 (Reynolds, B. A. et al., (1992) J. Neurosci. 12:4565-74; Vescovi, A. L. et al., (1993) Neuron 11:951-66; Reynolds, B. A. and Weiss, S., (1996) Dev Biol. 175:1-13) を用い、ヒト神経幹細胞／前駆細胞から成る *neurosphere* を培養した。培養法の詳細は金村らの方法 (Kanemura, Y. et al., (2002) J. Neurosci. Res. 69:869-79) に従った。

【0024】

底面積 75 cm² の細胞培養用フラスコあたり 3 × 10⁶ 個の細胞を 4 日間前培養した後、遠心し、レチノイン酸及び 1 % ウシ胎児血清を添加した培地に再懸濁した。培養開始後 7 日目に新鮮な培地に交換し、14 日目まで培養を続けた細胞を分化誘導群 A とした。また、同様に 4 日間の前培養を行った後、ウシ胎児血清の最終濃度を 10 % にした培地中で

細胞を増殖させ、2回の継代を経てコンフルエントに達するまで培養を続けた細胞を分化誘導群Bとした。

【0025】

(3) ノーザン法

neurosphereを構成する細胞、分化誘導群A及びBから全RNAを抽出し、その1 μ gを1%ホルムアミドを含有するアガロースゲルに展開した後、ナイロンメンブレン(Hybond-N; Amersham Bioscience社製)に転写した。RNAを転写したメンブレンと(1)で作製した標識RNAプローブをDIG Easy Hyb Buffer (Roche Molecular Biochemicals社製)中で68℃1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後メンブレンを洗浄し、Anti-Digoxigenin-AP、Fab Fragment (Roche Molecular Biochemicals社製)と反応させ、CDP-Star chemiluminescent substrate (Amersham Bioscience社製)により検出を行った。

【0026】

(4) 結果

上記(1)～(3)の材料と方法によりヒト神経幹細胞/前駆細胞及び分化を誘導した細胞におけるNC1遺伝子の発現を検討した。図1はその解析結果を示したものである。ヒト胎児組織から調製したneurosphereは神経幹細胞/前駆細胞から成る。また、分化誘導群Aはニューロンの形質を有するチューブリンBIII陽性細胞及びアストロサイトの形質を有するGFAP (glial fibrillary acidic protein) 陽性細胞から成り、分化誘導群Bではほぼすべての細胞がGFAP陽性細胞から構成される。これらの培養系におけるNC1遺伝子の発現は、neurosphereでは顕著に高く、分化誘導群A及びBではともに低い発現しか見られなかった(図1)。この結果は、NC1遺伝子の発現が神経幹細胞/前駆細胞で高く、ニューロンやアストロサイトへの分化に伴って発現が低下することを示すものである。このようにNC1遺伝子が神経幹細胞/前駆細胞で特異的に高い発現を示すことから、この遺伝子を神経幹細胞マーカーとして応用できる可能性が示された。

【0027】

(実施例2)

ウェスタン法によるNC1遺伝子産物の検出

ウェスタン法によりNC1遺伝子産物を検出するために以下の実験を行った。

【0028】

(1) NC1遺伝子産物に対する抗体の作製

NC1遺伝子がコードするタンパクの部分ペプチドを抗原として、NC1遺伝子産物に反応する抗体を作製した。実際にはNC1遺伝子産物の部分ペプチドである配列番号4に記載されたアミノ酸配列を有するペプチドを合成し、ウサギに免疫して抗血清を得た。この抗血清が元のペプチドと1万倍以上のタイターで反応することをELISAで確認し、NC1遺伝子産物に対する抗体を含む抗血清とした。

【0029】

(2) 供試細胞と細胞抽出液の調製

(実施例1)でNC1遺伝子の発現が検出されたヒト胎児神経組織から調製したneurosphereに対して、(1)で作製した抗血清を用いたウェスタン法によるNC1遺伝子産物の検出を検討した。またNC1遺伝子の発現が検出されなかったJurkat細胞及びJurkat細胞にNC1遺伝子発現ベクターを導入した形質転換株についても同様にウェスタン法によるNC1遺伝子産物の検出を試みた。これらの細胞から全細胞抽出液を調製し、さらにN-XTRACTキット(SIGMA社製)を用いて細胞質画分と核画分を調製した。

【0030】

(3) ウェスタン法

(2)で調製した試料を95℃で5分間加熱後SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、ニトロセルロースメンブランに転写した。メンブランはブロッキング液(5%スキムミルク、0.1%Tween-20を含有するトリス緩衝液)でブロッキングした後、(1)で作製した抗血清を添加した。メンブランを洗浄した後ホースラディッシュ・パーオキシダーゼで標識した抗ウサギIgG抗体(Amersham Bioscience社製)を反応させ、ECL(Amersham Bioscience社製)を用いて反応する画分を検出した。

【0031】

(4) 結果

上記(1)～(3)の材料と方法により、作製した抗血清によるNC1遺伝子産物の検出を検討した。この抗血清はNC1遺伝子を発現していないJurkat細胞とは反応しない(図2 レーン1)が、Jurkat細胞にNC1遺伝子を強制発現させた形質転換株(Jurkat-NC1)とは反応し、NC1遺伝子産物に相当するバンドが検出された(図2 レーン2)。これは(1)で作製した抗血清がNC1遺伝子産物を認識し、少なくともウェスタン法により検出することが可能であることを示すものである

【0032】

また、ヒト胎児神経組織から調製したneurosphereに対してウェスタン法を行ったところ、NC1遺伝子を強制発現させたJurkat-NC1と同じ位置に抗血清と反応するバンドが検出された(図3)。さらにJurkat-NC1では細胞質画分、核画分双方に反応しているが、neurosphereでは細胞質画分にのみ反応性が認められた。したがって、この抗血清を用いたウェスタン法によりneurosphere等の神経幹細胞/前駆細胞におけるNC1遺伝子産物の存在を検出できる。また、全細胞抽出液だけでなく分画した抽出液とも反応することから、NC1遺伝子産物の細胞内局在性を示すことも可能である。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】ノーザン法によるNC1遺伝子の発現解析の結果を示す図である。NC1はNC1遺伝子由来mRNAの移動度に相当する位置を示す。

【図2】Jurkat細胞に強制発現させたNC1遺伝子産物をウェスタン法により検出した結果を示す図である。レーン1にはJurkat細胞由来全RNAを、レーン2にはNC1遺伝子を強制発現させたJurkat細胞由来の全RNAを電気泳動した。

【図3】Jurkat細胞に強制発現させたNC1遺伝子産物及びneurosphereに存在するNC1遺伝子産物をウェスタン法により検出した結果を示す図である。レーン1、4は全細胞抽出液を、レーン2、5には細胞質画分を、レーン3、6には核画分を電気泳動した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 鐘淵化学工業株式会社 Kaneka Corporation

独立行政法人産業技術総合研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

財団法人先端医療振興財団 Foundation for Biomedical Research and Innovation

<120> 新規な神経幹細胞マーカー

<130> TKS-5118

<160> 6

<210> 1

<211> 749

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NC1 probe

<400> 1

```
ggagcttggt aatgcaggtg gtgaaggagc aggttatgag agcacttaca accaagccta 60
gctccctgga ccagttcaag agcaaactgc agaacctgag ctacactgag atcctgaaaa 120
tccgccagtc cgagaggatg aaccaggaag atttcagtc ccgcccgatt ttggaactaa 180
aggagaagat tcagccagaa atcttagagc tgatcaaaca gcaacgcctg aaccgccttg 240
tggaagggac ctgctttagg aaactcaatg cccggcggag gcaagacaag ttttggtatt 300
gtcggctttc gccaaatcac aaagtcctgc attacggaga cttagaagag agtcctcagg 360
gagaagtgcc ccacgattcc ttgcaggaca aactgccggt ggcagatata aaagccgtgg 420
tgacgggaaa ggactgccct catatgaaag agaaaggtgc ccttaaaca aacaaggagg 480
tgcttgaact cgctttctcc atcttgtatg actcaaactg ccaactgaac ttcacgctc 540
ctgacaagca tgagtactgt atctggacag atggactgaa tgcgctactc gggaaggaca 600
tgatgagcga cctgacgcgg aatgacctgg acaccctgct cagcatggaa atcaagctcc 660
gcctcctgga cctggaaaac atccagatcc ctgacgcacc tccgccgatt cccaaggagc 720
ccagcaacta tgacttcgtc tatgactgt 749
```

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NC1 forward primer

<400> 2

ggagcttggt aatgcaggtg g 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NC1 reverse primer

<400> 3

acagtcataag acgaagtcata a 21

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NC1 epitope peptide

<400> 4

Ala Pro Pro Pro Ile Pro Lys Glu Pro Ser Asn Tyr Asp Phe Val Tyr

1

5

10

15

Asu Cys Asn

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NC1 epitope peptide

<400> 5

Cys Pro His Met Lys Glu Lys Gly Ala Leu Lys Gln Asn Lys Glu Val

1

5

10

15

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NC1 epitope peptide

<400> 6

Phe Arg Lys Leu Asn Ala Arg Arg Arg Gln Asu Lys Phe Trp Tyr Cys

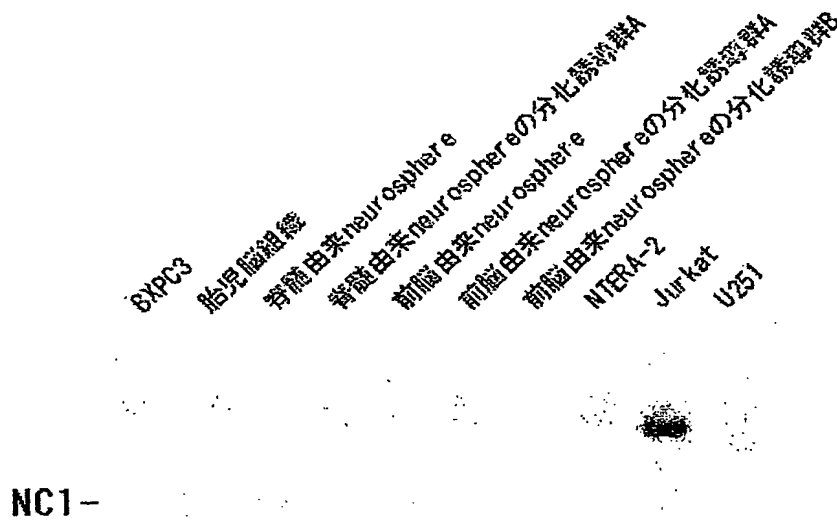
1

5

10

15

【書類名】 図面
【図 1】



28S rRNA-



【図 2】

分子量 [kDa]

1

2

200 -

150 -

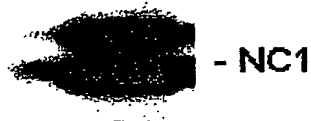
100 -

75 -

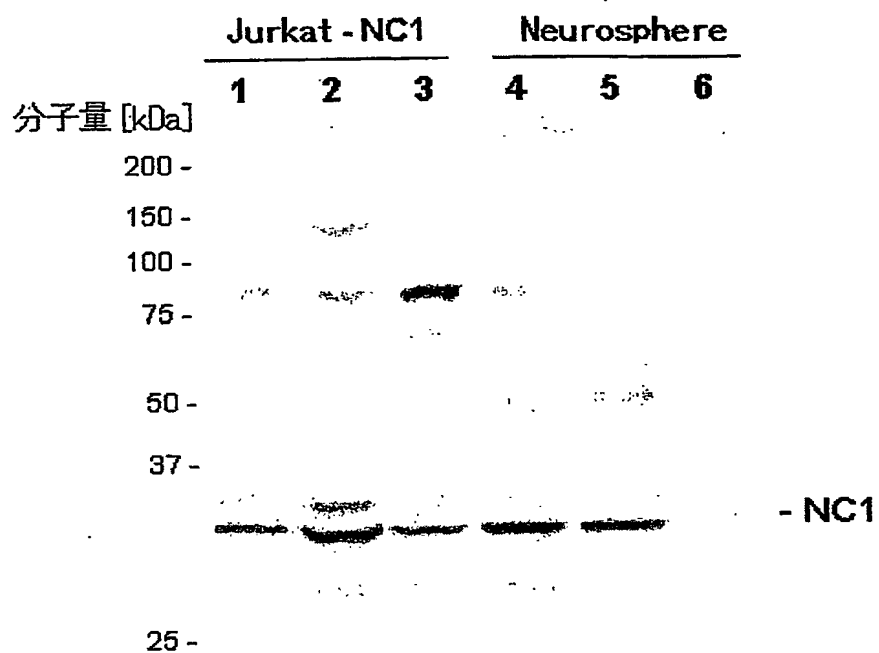
50 -

37 -

25 -



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 複数の細胞種から構成される組織或いは細胞集団から神経幹細胞／前駆細胞を検出する方法及びそれを用いて神経分化因子等として機能する薬剤をスクリーニングする方法を提供すること。

【解決手段】 NC1 遺伝子が未分化な段階の神経幹細胞で発現が高く、分化に伴って発現が低減することを見出した。NC1 遺伝子及びその遺伝子産物（NC1 蛋白質）、あるいはそれらに由来する塩基配列、アミノ酸配列、さらには抗体等を用いることにより、様々な方法で神経幹細胞／前駆細胞を検出することが可能となり、神経分化因子等として機能する薬剤の新たなスクリーニング法が提供された。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-321564
受付番号	50301519077
書類名	特許願
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成16年 2月12日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 9月12日

特願 2 0 0 3 - 3 2 1 5 6 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 9 4 1]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 7 日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号
氏 名 鐘淵化学工業株式会社
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 9 月 1 日
[変更理由] 名称変更
住 所 大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号
氏 名 株式会社カネカ

特願 2 0 0 3 - 3 2 1 5 6 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2003-321564

出願人履歴情報

識別番号

[300061835]

1. 変更年月日

2003年 7月 7日

[変更理由]

住所変更

住 所

兵庫県神戸市中央区港島南町2丁目2番

氏 名

財団法人先端医療振興財団